

Title	Development of Peptide Vaccine by Biodegradable Nanospheres with Detachable and Attachable Poly (ethylene glycol) Brushes
Author(s)	松本, 匡広
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34488
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (松本 匡広)	
論文題名	Development of Peptide Vaccine by Biodegradable Nanospheres with Detachable and Attachable Poly(ethylene glycol) Brushes (解離と再結合が可能なPEGブラシを有する生分解性ナノスフェアを用いたペプチドワクチンの創製)
<p>機能性高分子ナノ粒子は、高い比表面積を有し、そのサイズや表面特性を様々に制御可能であることから、ドラッグデリバリーシステム (DDS) におけるキャリアや、医療診断薬、分離担体といった医療材料への応用が注目されている。このようなナノ粒子の開発では、血中や検体中に含まれるタンパク質の粒子表面への非特異的吸着を抑制することが重要な課題である。タンパク質の材料表面への非特異的な吸着は、機能的に設計された表面の構造を損なわせるだけでなく、生体中においては免疫反応や血液凝固反応といった生体反応を引き起こす危険性がある。タンパク質の非特異的吸着を抑制する手法として、ポリマーを基材表面に高密度にグラフトしたポリマーブラシ構造の構築が注目を集めている。高密度なポリマーブラシは、その構造に由来して、サイズ排除効果や立体反発、水和層の効果によってタンパク質の非特異的吸着を抑制できるため、ドラッグキャリアの表面修飾への応用が期待される。しかし通常、ポリマーブラシは固体表面に固定化された開始基からのリビング重合により合成されるため、ドラッグキャリアを目的とした生分解性ナノ粒子の表面へポリマーブラシを構築することは困難であった。</p> <p>一方、当研究室では高い運動性と親水性により、生体不活性であり優れたタンパク質の非特異的吸着抑制能を示すポリエチレングリコール (PEG) に着目し、ブラシ構造を有するPEGコロナとポリフェニルアラニン (PPhe) コアから成るコア-コロナ型生分解性ナノ粒子 (ペプチドナノスフェア) について報告してきた。本ナノ粒子は、PEG開始剤と低分子開始剤の二種類の開始剤を同時に用いたフェニルアラニン (Phe) α-カルボキシ無水物 (NCA) の開環重合により一段階で得られる。¹H NMRやX線回折 (XRD)、FT-IR測定による構造解析から、コアを形成するPPheのβシート構造に由来して、ブロックコポリマーを構成するもう一方のセグメントであるPEG鎖が高密度に集積化し、その結果としてブラシ構造を形成していることが示唆された。本ナノ粒子はPEGブラシ構造に由来して生体不活性であり、タンパク質の吸着抑制能を有していた。さらに、PEG鎖とコアの間にジスルフィド結合を導入することで、還元反応によりジスルフィド結合が開裂し、表面PEG鎖が解離することで、表面特性を親水性から疎水性まで制御することが可能であった。これらの物性は、上記で挙げたドラッグキャリアとしての物性を満たすことから、本ナノ粒子のドラッグキャリアへの応用が期待されるが、具体的な検討はなされていない。</p> <p>本学位論文では、新しいがんの治療法として期待されているペプチドワクチンに着目した。1991年、Bruggenらによってがん細胞が発現する特定のペプチド配列 (抗原ペプチド) が免疫細胞によって特異的に認識されることが報告されて以来、種々のがん (細胞) に対する抗原ペプチドが同定されてきた。これらの発見により、がんを免疫療法により治療できる可能性が見出され、手術や抗がん剤、放射線療法に続く、第四の治療法として盛んに研究されている。初期の研究から、ペプチドのみの投与では、意図と反して、がんが増大することが明らかとなっている。この原因として、①抗原ペプチドが活性化されていない抗原提示細胞 (未成熟樹状細胞) に結合すること、②ペプチドが低分子であるため投与部からの拡散が速く、他の細胞に結合すること、の二点が挙げられる。これらの問題を解決するために、①抗原提示細胞の活性化能を有するアジュバント、および②サイズにより投与部位での滞留性を向上させる生分解性高分子微粒子との併用が検討されてきた。このようなキャリアには、上述した、非特異的な生体反応を引き起こさないためのタンパク質の非特異的吸着抑制能に加えて、担持した抗原ペプチドとアジュバントを細胞内へ選択的に送達する機能が求められる。これまで主に、グリコール酸と乳酸の共重合体からなる微粒子などがキャリアとして検討され一定の成果が得られているが、これら既存のキャリアでは、抗原ペプチドおよびアジュバントの担持が物理吸着によるため、依然として投与部からの拡散を防ぐことができず、非特異的な免疫反応による副作用の危険性を排除できない。</p> <p>この問題を解決するために、抗原ペプチドの担持を化学結合、特に細胞内環境で開裂する共有結合により行うことが必要であると考えた。そこで、当研究室で得られたPEGブラシを有する生分解性ナノ粒子をペプチドキャリアとして適用することを着想した。本ナノ粒子は粒子表面のPEGブラシに由来したタンパク質の吸着抑制能を有する。さらに、PEG鎖とPPheコアがジスルフィド結合を介して結合しているため、これを還元反応により開裂させ、得られた表面チオ</p>	

ール基を用いて抗原ペプチドなどの薬理活性を有する分子を担持できる。一般的に細胞内は還元環境であるため、ジスルフィド結合は最も直接的な細胞内環境応答性を示す共有結合であり、抗原ペプチドの細胞内選択的送達に最適な担持様式であると考えられる。また近年、アジュバント活性を有する分子に関する集約的知見から、疎水性がアジュバント活性に重要な役割を果たしていることが指摘されてきており、極めて稀な例であるが、疎水性セグメントを有する両親媒性・ β -ポリグルタミン酸粒子やポリ酸無水物粒子は、キャリアでありながら単独でアジュバント活性を有することが報告されている。これらのことから、本ナノ粒子は細胞内還元環境下でPEG鎖が解離し、疎水性コアが露出することで樹状細胞を活性化することが予見される。つまり、本ナノ粒子は、細胞に取り込まれる前はタンパク質の非特異的吸着の抑制能と抗原ペプチドの安定な担持により、非特異的な免疫反応などの副作用の危険性を抑制する。そして、細胞に取り込まれた後、PEG鎖の解離と抗原ペプチドの送達により、抗原特異的な免疫反応を誘導することが期待される。以上のことから本ナノ粒子を用いることにより、従来成し得なかった安全で治療効果の期待されるペプチドワクチンシステムの創製が期待される。

本学位論文は以下の三章から成る。

一章では、PEGとPPheコアの間にジスルフィド結合を導入したナノ粒子を合成し、表面PEG鎖の還元的解離と酸化的結合の反応条件を検討した。この知見を基に、抗原ペプチドのナノ粒子への担持を行った。

二章では、一章で得られた知見を基に、タンパク質の非特異的吸着を抑制するために最適なPEG鎖の密度や分子量について明らかにすると共に、その理由を考察した。

三章では、一章と二章で得られた知見を基に、タンパク質の非特異的吸着抑制能とペプチドの担持能を両立可能なナノ粒子の表面分子設計を行い、樹状細胞およびマウスを用いた実験によりナノ粒子のワクチンキャリアとしての可能性を明らかにした。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (松本匡広)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	明石 満
	副 査	教 授	三浦 雅博
	副 査	教 授	関 修平
	副 査	教 授	井上 佳久
	副 査	教 授	神戸 宣明
	副 査	教 授	茶谷 直人
	副 査	教 授	生越 専介
	副 査	教 授	真嶋 哲朗
	副 査	教 授	安蘇 芳雄
	副 査	教 授	芝田 育也
論文審査の結果の要旨			
<p>ペプチドワクチンは、化学合成により高純度で大量に製造できるため、従来ワクチンの製造が困難であったがんなどの疾患の治療への応用が期待されている。しかし、従来のシステムでは免疫誘導効果が弱く、副作用が起こる危険性が明らかになっている。本論文は、ペプチドワクチンの安全性と効果を確立するために、従来のシステムの課題を明確化し、その課題を解決するため、生分解性ナノ粒子キャリアを新規に設計・合成し、ペプチドワクチンキャリアとしての機能を実証している。主な成果を要約すると次の通りである。</p> <p>(1) ポリフェニルアラニン (PPhe) コアのナノ粒子表面にポリエチレングリコール (PEG) 鎖が高密度にグラフトしたコア-コロナ型ナノ粒子を合成し、その基本的な加水分解特性を明らかにしている。さらに、細胞環境での還元環境に応答して PEG 鎖を自発的に解離させるために、PEG 鎖と PPhe コアの間にはジスルフィド結合を導入したナノ粒子を合成し、PEG 鎖の還元的解離と酸化的結合挙動について詳細に検討している。</p> <p>(2) PEG 鎖の還元的解離と酸化的結合に基づき、ナノ粒子表面の分子設計を行い、生体分子、特にタンパク質の非特異的吸着を抑制するために最適な PEG 鎖の密度や分子量、組成について見出している。</p> <p>(3) ペプチドワクチンキャリアとして最適なナノ粒子表面の分子設計を行い、赤血球を用いたモデル実験や実際に樹状細胞を用いた実験によりそれを証明している。ナノ粒子表面の PEG 鎖は、細胞外ではタンパク質の非特異的吸着を効果的に抑制し、細胞内では還元環境を認識して自発的に解離し、一部露出した疎水性のコア表面が樹状細胞を活性化することを明らかにしている。さらに、マウス免疫実験の結果から、ナノ粒子が従来のシステムと比較してより高い免疫誘導効果を有していることを実証している。</p> <p>以上の結果は、ペプチドワクチンキャリアとしての適切な分子設計指針を示したものであり、高い安全性と効果を有するペプチドワクチンの確立に寄与することが期待される。</p> <p>よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。</p>			